

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202090863** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.09.04

(22) Дата подачи заявки
2018.10.24

(51) Int. Cl. *A23C 9/123* (2006.01)
A23C 19/032 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 7/26 (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
A23L 29/00 (2016.01)
A23L 27/00 (2016.01)

**(54) ЛАКТОБАЦИЛЛУС RHAMNOSUS С ПОВЫШЕННЫМ ПРОДУЦИРОВАНИЕМ ПО
ДИАЦЕТИЛУ**

(31) **17198907.2**

(32) **2017.10.27**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2018/079150**

(87) **WO 2019/081577 2019.05.02**

(71) Заявитель:

КХР. ХАНСЕН А/С (DK)

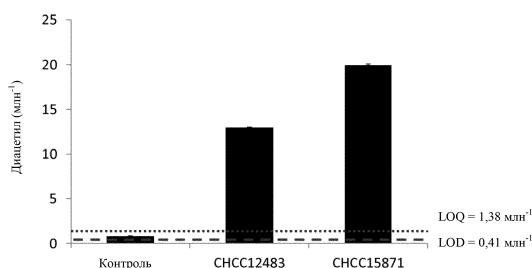
(72) Изобретатель:

**Нильсен Стина Диссинг Аунсбьерг,
Гулдагер Хелле Сков, Нильсен
Сесилие Люкке Марвиг (DK)**

(74) Представитель:

**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В.,
Бучака С.М., Бельтюкова М.В. (RU)**

(57) Настоящее изобретение относится к композиции, подходящей для приготовления молочного продукта, содержащей по меньшей мере одну стартовую культуру и штамм *Lactobacillus rhamnosus*, способный придавать молочному продукту усиленный сливочный вкус без негативного влияния на реологию, время ферментации или постацилирование молочного продукта. Кроме того, настоящее изобретение относится к процессам получения молочного продукта, такого как йогурт пониженной жирности или сыр, который имеет высокое содержание диацетила. Штамм *Lactobacillus rhamnosus*, полезный для получения такого молочного продукта, также представляет собой часть настоящего изобретения.



A1

202090863

202090863

A1

PCT/EP2018/079150

МПК: *A23C 9/123* (2006.01)*A23C 19/032* (2006.01)*C12N 1/20* (2006.01)*C12P 7/26* (2006.01)*C12R 1/225* (2006.01)*A23L 29/00* (2016.01)*A23L 27/00* (2016.01)

LACTOBACILLUS RHAMNOSUS С ПОВЫШЕННЫМ ПРОДУЦИРОВАНИЕМ ПО ДИАЦЕТИЛУ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к композиции, подходящей для получения молочного продукта, содержащего штамм *Lactobacillus rhamnosus*, способный придавать молочному продукту усиленный сливочный вкус посредством значительного продуцирования диацетила без негативного влияния на реологию молочного продукта. Композицию по изобретению можно применять вместе со стартовой культурой или в ее составе для получения молочного продукта. Кроме того, настоящее изобретение относится к процессам получения молочного продукта, такого как йогурт пониженной жирности, сыр и сметана, который имеет высокое содержание диацетила. Штамм *Lactobacillus rhamnosus*, полезный для получения таких молочных продуктов, также представляет собой часть настоящего изобретения.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В WO2012/136830 раскрывается противогрибковый штамм *Lactobacillus rhamnosus* для производства молочного продукта.

В молочной промышленности продукты с низким содержанием жира или без жира претерпевают растущий спрос со стороны потребителей. Однако такие молочные продукты пониженной жирности часто проявляют отсутствие сливочного вкуса.

Диацетил представляет собой ценный продукт и его используют в молочной промышленности в качестве образующего вкус сливочного масла соединения, добавляемого к таким продуктам, как маргарины и продукты на масляной основе растительного масла.

Гетеромолочнокислые бактерии образуют диацетил/ацетоин в качестве побочного продукта наряду с лактатом в качестве основного продукта. Клетки образуют активный ацетальдегид из пирувата и тиаминпирофосфата посредством пируватоксидазы. Активный ацетальдегид конденсируется с еще одной молекулой пирувата и образует альфа-ацетолактатсинтазу. Образование диацетила в *Lactobacillus rhamnosus* не очень хорошо понятно – было высказано предположение, что у *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar.

diacetylactis альфа-ацетолактат окисляется до диацетила посредством альфа-ацетолактатоксидазы (Jyoti et al 2003). Ацетоин образуется непосредственно путем декарбоксилирования альфа-ацетолактата. Образование ацетона также может происходить необратимо из диацетила в ацетоин посредством диацетилредуктазы.

Lactobacillus rhamnosus представляет собой гетеромолочнокислую бактерию, которую можно использовать для продуцирования вкусовых соединений, подобных диацетила и ацетону (Jyoti et al. 2003). Уровень продуцированного диацетила зависит от штамма, а также субстрата, на котором его выращивают.

Патент US4867992 и патент US5236833 относятся к процессам получения диацетила путем ферментации кофейного субстрата и пектинового субстрата, соответственно, с помощью продуцирующих молочную кислоту бактерий.

Получение, концентрация и добавление диацетила и/или ацетона к пищевым продуктам связано с существенными затратами.

US 4678673 направлен на продукты масличных культур, ферментированных с помощью штамма *Lactobacillus rhamnosu*, который продуцирует диацетил и ацетоин. Ферментированные продукты масличных культур имеют вкус сливочного масла или похожий на молочный. Отсутствует упоминание применения *Lactobacillus rhamnosus* в молочных продуктах.

В WO2012/136832 раскрыт продуцирующий диацетил штамм *Lactobacillus rhamnosus* для получения молочного продукта.

Существует потребность в молочнокислых бактериях с повышенным продуцированием по диацетила для изготовления молочных продуктов.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить композицию и способ получения молочного продукта, улучшенного благодаря усиленному сливочному вкусу, приданному благодаря присутствию штамма *Lactobacillus rhamnosus*.

Еще одна задача настоящего изобретения заключается в том, чтобы предложить новый штамм *Lactobacillus rhamnosus* с улучшенными свойствами в отношении к способности придавать усиленный сливочный вкус молочному продукту, такому как йогурт или сыр.

Дополнительные задачи станут очевидными далее в данном документе, и все другие задачи будут явными специалисту в данной области техники, к которой принадлежит изобретение.

Как можно видеть в действующих примерах в этом документе, описанный штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871, который был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) с номером доступа DSM32666, продуцирует диацетил и ацетоин, посредством этого придавая усиленный сливочный вкус молочному продукту без значительного негативного воздействия на реологию и последующее ацилирование молочного продукта.

Также, неожиданно было обнаружено, что штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 по изобретению в дополнение к его высокой активности продуцирования диацетила имеет высокую противогрибковую активность. В частности, штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 по изобретению имеет повышенную активность против роста дрожжей по сравнению с обычными противогрибковыми штаммами *Lactobacillus rhamnosus*.

Таким образом, первый аспект настоящего изобретения относится к композиции, содержащей штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871, который был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) с номером доступа DSM32666, или его мутантный штамм, где мутантный штамм получен в результате использования депонированного штамма в качестве материнского штамма, и где мутантный штамм имеет такое же или более высокое продуцирование диацетила по сравнению с материнским штаммом.

Второй аспект настоящего изобретения относится к применению композиции согласно первому аспекту настоящего изобретения для получения молочного продукта.

Третий аспект настоящего изобретения направлен на способ приготовления молочного продукта, где способ включает стадии:

- а) инокулирования молочного субстрата композицией согласно первому аспекту настоящего изобретения;
- б) ферментации молочного субстрата;
- в) возможно, добавления дополнительных микроорганизмов и/или добавок к молочному субстрату;
- г) возможно, последующую обработку молочного субстрата; и
- д) возможно, упаковку молочного продукта.

Четвертый аспект изобретения относится к молочному продукту, получаемому посредством способа согласно третьему аспекту изобретения.

Пятый аспект настоящего изобретения относится к штамму *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871, который был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и

клеточных культур (DSMZ) с номером доступа DSM32666, или его мутантному штамму, где мутантный штамм получен путем использования депонированного штамма в качестве материнского штамма, и где мутантный штамм имеет такое же или более высокое продуцирование диацетила по сравнению с материнским штаммом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показаны уровни диацетила после хранения при $7\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14 суток в ферментированных молочных продуктах, ферментированных с помощью только одной стартовой культуры (контроль) или стартовыми культурами в комбинации с *Lb. rhamnosus* CHCC12483 или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871. LOD: Предел обнаружения. LOQ: Предел количественного определения.

На Фиг. 2 показаны уровни ацетоина после хранения при $7\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14 суток в ферментированных молочных продуктах, ферментированных с помощью только одной стартовой культуры (контроль), или стартовых культур в комбинации с *Lb. rhamnosus* CHCC12483 или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871. LOD: Предел обнаружения. LOQ: Предел количественного определения.

На Фиг. 3 показан рост дрожжей на чашках с молоком, ферментированным с помощью только одной стартовой культуры (контроль, первая чашка), вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC12483 (вторая чашка) или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871 (третья чашка) для 4 разных загрязнителей дрожжей А, В, С и D и для трех концентраций дрожжей (верхний, средний и нижний ряд).

На Фиг. 4 показан рост дрожжей на чашках с молоком, ферментированным с помощью только одной стартовой культуры (контроль, первая чашка), вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC12483 (вторая чашка), вместе со сравнительным штаммом *Lb. rhamnosus* (третья чашка) или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871 (четвертая чашка) для одного загрязнителя дрожжей и для трех концентраций дрожжей (верхний, средний и нижний ряд).

На Фиг. 5 показаны рост плесневых грибов на чашках с молоком, ферментированным с помощью только одной стартовой культуры (контроль, первая чашка), или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC12483 (вторая чашка) или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871 (третья чашка) для 3 разных загрязнителей плесневого гриба А, В и С и для 2 разных температур (верхний и нижний ряд чашек).

На Фиг. 6 показан профиль подкисления ферментированных молочных продуктов во время ферментации при 43°C . Продукты ферментируют с помощью единственной

стартовой культуры, контроля, или стартовой культуры в комбинации со штаммами *Lb. rhamnosus* CHCC12483 или *Lb. rhamnosus* CHCC15871.

На Фиг. 7 показан рост pH в ферментированных молочных продуктах в зависимости от времени при хранении при $7\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 21 суток. Продукты ферментируют с помощью единственной стартовой культуры, контроля, или стартовой культуры в комбинации со штаммами *Lb. rhamnosus* CHCC12483 или *Lb. rhamnosus* CHCC15871.

На Фиг. 8 показан рост плесневых грибов на чашках с молоком, ферментированным с помощью только одной стартовой культуры (контроль, первая чашка) или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871 (вторая чашка) для 3 разных загрязнителей плесневого гриба А, В и С.

На Фиг. 9 показано время ферментации (в минутах) до конечного pH 4,50 при 30°C . Продукты ферментируют с помощью только одной из пяти разных стартовых культур для сметаны (SC1–SC5) и в комбинации их со штаммами *Lb. rhamnosus* CHCC15871 или *Lb. rhamnosus* CHCC12697.

На Фиг. 10 показаны уровни диацетила (млн^{-1} , среднее плюс/минус станд. отклонение) после хранения при $5\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 7 и 21 суток в ферментированных сметанных продуктах, ферментированных с помощью только одной из пяти разных стартовых культур (SC1–SC5) и в комбинации со штаммами *Lb. rhamnosus* CHCC15871 или *Lb. rhamnosus* CHCC12697.

На Фиг. 11 показаны уровни ацетоина (млн^{-1} , среднее плюс/минус станд. отклонение) после хранения при $5\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 7 и 21 суток в ферментированных сметанных продуктах, ферментированных с помощью только одной из пяти разных стартовых культур (SC1–SC5) и в комбинации со штаммами *Lb. rhamnosus* CHCC15871 или *Lb. rhamnosus* CHCC12697.

На Фиг. 12 показано измерение реологических характеристик ферментированных сметанных продуктов после хранения при $5\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 7 суток. Напряжение сдвига (P_a , среднее плюс/минус станд. отклонение) при скорости сдвига 300 (1/с), полученной из данных реологической кривой. Образцы, ферментированные с помощью только одной из пяти разных стартовых культур (SC1–SC5) и в комбинации со штаммами *Lb. rhamnosus* CHCC15871 или *Lb. rhamnosus* CHCC12697.

На Фиг. 13 показаны уровни диацетила (млн^{-1} , среднее плюс/минус станд. отклонение) после хранения при $7\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14 суток в йогуртовых продуктах, ферментированных с помощью только одной стартовой культуры и в комбинации с 8

разными штаммами *Lb. rhamnosus* (CHCC15871, CHCC12483, штамм 1, штамм 2, штамм 3, штамм 4, штамм 5 и штамм 6).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

При использовании в этом документе, термин «молочнокислая бактерия» обозначает грамположительную, микроаэрофильную или анаэробную бактерию, которая ферментирует сахара с продуцированием кислот, включая молочную кислоту в качестве преимущественно продуцированной кислоты, уксусную кислоту и пропионовую кислоту. Наиболее полезные в промышленном отношении молочнокислые бактерии находят в порядке “Lactobacillales”, который включает *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp., *Enterococcus* spp. и *Propionibacterium* spp. Кроме того, продуцирующие молочную кислоту бактерии, принадлежащие к группе строгих анаэробных бактерий, бифидобактерий, а именно *Bifidobacterium* spp., обычно включают в группу молочнокислых бактерий. Они часто используются в качестве пищевых культур, одной или в комбинации с другими молочнокислыми бактериями.

Молочнокислые бактерии, включая бактерии видов *Lactobacillus* spp. и *Streptococcus thermophilus*, обычно поставляются в молочную промышленность в виде или замороженных, или лиофилизированных культур для размножения пищевой закваски или в виде так называемых культур «для прямого внесения» (DVS), предназначенных для прямой инокуляции в ферментационный чан или ванну для приготовления молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт или сыр. Такие молочнокислые бактериальные культуры обычно называются “стартовыми культурами” или “заквасками”.

Термин “мезофил” в этом документе относится к микроорганизмам, которые успешно размножаются лучше всего при умеренных температурах (15°C-40°C). Наиболее полезные в промышленном отношении мезофильные бактерии включают *Lactococcus* spp. и *Leuconostoc* spp. Термин “мезофильная ферментация” в этом документе относится к ферментации при температуре от примерно 12°C и до примерно 35°C. Термин “мезофильный молочный продукт” относится к молочным продуктам, полученным посредством мезофильной ферментации мезофильной стартовой культуры, и включает такие молочные продукты как пахта, простокваша, сквашенное молоко, сметана, кислые густые сливки и мягкий сыр, такой как варк, творог и сливочный сыр.

Термин “термофил” в этом документе относится к микроорганизмам, которые

успешно размножаются лучше всего при температурах выше 43°C. Наиболее полезные в промышленном отношении термофильные бактерии включают *Streptococcus* spp. и *Lactobacillus* spp. Термин “термофильная ферментация” в этом документе относится к ферментации при температуре выше примерно 35°C. Термин “термофильный молочный продукт” относится к молочным продуктам, полученным путем термофильной ферментации термофильной стартовой культуры, и включает такие молочные продукты как йогурт.

Термин «молоко» следует понимать как выделение молока, получаемого посредством доения любого млекопитающего, такого как коровы, овцы, козы, буйволицы или верблюдицы. В предпочтительном воплощении молоко представляет собой коровье молоко. Термин «молоко» также включает растворы белка/масла, изготовленные из растительного сырья, например соевое молоко.

Термин «молочный субстрат» может представлять собой любое сырое и/или переработанное молочное сырье, которое может быть подвергнуто ферментации согласно способу по изобретению. Таким образом, полезные молочные субстраты включают, но без ограничения, растворы/суспензии любых молочных или подобных молочным продуктов, содержащих белок, такие как цельное или пониженной жирности молоко, обезжиренное молоко, пахта, восстановленное сухое молоко, сгущенное молоко, сухое молоко, сыворотка, сывороточный пермеат, лактоза, маточная жидкость от кристаллизации лактозы, сывороточный белковый концентрат или сливки. Очевидно, что молочный субстрат может поступать от любого млекопитающего, например представляя собой главным образом чистое молоко млекопитающего или восстановленное сухое молоко.

Перед ферментацией молочный субстрат может быть гомогенизирован и пастеризован согласно способам, известным в данной области техники.

«Гомогенизация» при использовании в этом документе означает интенсивное смешивание для получения растворимой суспензии или эмульсии. Если гомогенизацию выполняют до ферментации, ее можно выполнять таким образом, чтобы раздробить молочный жир до более мелких размеров так, чтобы он больше не отделялся от молока. Это может быть выполнено путем нагнетания молока при высоком давлении через небольшие отверстия.

«Пастеризация» при использовании в этом документе означает обработку молочного субстрата для снижения или исключения присутствия живых организмов, таких как микроорганизмы. Предпочтительно, пастеризация достигается путем поддержания заданной температуры в течение заданного периода времени. Заданная

температура обычно достигается посредством нагревания. Температура и продолжительность могут быть выбраны с целью уничтожения или инактивирования конкретных бактерий, таких как опасные бактерии. Вслед за ней можно выполнять стадию быстрого охлаждения.

«Ферментация» в способах по настоящему изобретению означает превращение углеводов в спирты или кислоты посредством действия микроорганизма. Предпочтительно, ферментация в способах по изобретению включает превращение лактозы в молочную кислоту.

Процессы ферментации для приготовления молочных продуктов хорошо известны, и специалист в данной области техники будет знать, как выбрать подходящие условия процесса, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма(ов) и продолжительность процесса. Очевидно, что условия ферментации выбирают таким образом, чтобы раскрыть достижение настоящего изобретения, то есть получить молочный продукт в твердой (такой как сыр) или жидкой форме (такой как ферментированный молочный продукт).

В данном контексте термин «напряжение сдвига» обуславливают вязкость. Вязкость (единица представляет собой Па·с) определяется как отношение напряжения сдвига (Па) к скорости сдвига (1/с).

Величина напряжения сдвига представляется в качестве стандарта в этом документе при скорости сдвига равной 300 1/с. Сенсорные эксперименты показали (данные не показаны), что лучшая корреляция между измерением реологических характеристик и сенсорной вязкостью/консистенцией во рту была обнаружена, когда использовали вязкость, измеренную при скорости сдвига 300 1/с.

Применительно к настоящему изобретению термин «напряжение сдвига» означает напряжение сдвига, которое измерено посредством следующего способа:

Через семь суток после инкубации ферментированный молочный продукт доводили до 13°C и вручную осторожно перемешивали с помощью палочки, снабженной перфорированным диском до наступления гомогенности образца. Реологические свойства образца оценивали на реометре (Anton Paar Physica Rheometer with ASC, Automatic Sample Changer, Anton Paar® GmbH, Austria) с использованием стаканчика с поплавком. Реометр настраивали на постоянную температуру 13°C в течение времени измерения. Настройки были следующие:

Время выдержки (до восстановления в какой-то степени изначальной структуры)

5 минут без любой физической нагрузки (колебания или вращения), приложенной к

образцу.

Стадия колебания (для измерения модуля упругости и вязкости, G' и G'' , соответственно, вычисляя таким образом суммарный модуль G^*)

Постоянная деформации = 0,3%, частота (f) = [0,5...8] Гц

6 точек измерения в течение 60 секунд (каждые 10 с)

Стадия вращения (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с)

Разработаны две стадии:

Скорость сдвига = [0,3-300] 1/с и 2) Скорость сдвига = [275-0,3] 1/с.

Каждая стадия включала 21 точку измерения за 210 с (каждые 10 с).

Напряжение сдвига при 300 1/с было выбрано для дополнительного анализа, так как оно коррелирует с консистенцией во рту при глотании ферментированного молочного продукта.

В данном контексте термин «мутант» следует понимать как штамм, полученный из штамма по изобретению посредством, например, генной инженерии, облучения, УФ света и/или химической обработки, и/или способов, которые индуцируют изменения в геноме. Предпочтительно, чтобы мутант представлял собой функционально эквивалентный мутант, например мутант, который имеет по существу такие же, как материнский штамм, или улучшенные свойства (например в отношении продуцирования диацетила, вязкости, жесткости геля, обволакивания полости рта, вкуса, постацилирования, скорости ацилирования и/или устойчивости против фагов). Такой мутант представляет собой часть настоящего изобретения. Термин «мутант» главным образом относится к штамму, полученному путем подвергания штамма по изобретению любой используемой обычно обработке для мутагенизации, включая обработку с помощью химического мутагена, такого как этилметансульфонат (EMS) или N-метил-N'-нитро-N-нитрогуанидин (NTG), УФ-излучение, или к спонтанно возникающему мутанту. В частности, мутант представляет собой естественный мутант, то есть мутант, полученный, например, путем подвергания материнского штамма обработке для мутагенизации, включающей выращивание материнского штамма в среде, лишенной одного или более обычно применяемых факторов роста, также называемой селекционным давлением. В связи с этим термин «естественный мутант» обозначает мутант, который не был получен посредством использования генной инженерии, облучения, УФ-излучения и/или химической обработки. Мутант может быть подвергнут нескольким обработкам для мутагенизации (единственную обработку следует понимать как содержащую одну стадию мутагенизации с последующей стадией скрининга/селекции), но в данном случае

предпочтительно, чтобы было выполнено не более 20, или не более 10, или не более 5 обработок (или стадий скрининга/селекции). В данном случае в предпочтительном мутанте менее 5%, или менее 1% или даже менее 0,1% нуклеотидов в бактериальном геноме были заменены другим нуклеотидом или делетированы по сравнению с материнским штаммом. В конкретном воплощении мутант содержит не более 20, в частности не более 10, в частности не более 5, в частности не более 4, в частности не более 3, в частности не более 2 и в частности не более 1 нуклеотидной мутации бактериального генома по сравнению с материнским штаммом, где мутация представляет собой замену, вставку или делецию одного нуклеотида.

Применение терминов «a» и «an» и «the» и аналогичных ссылок в контексте описания изобретения (главным образом в контексте следующей формулы изобретения) следует истолковывать охватывающим как единственное, так и множественное число, если в этом документе не указано иное или ясно не опровергается контекстом. Термины «содержащий», «имеющий», «включающий» и «включающий» следует истолковывать в качестве неограничивающих терминов (то есть означающих «включающий, но без ограничения»), если не указано иначе. Описание диапазонов значений в этом документе предназначено служить только в качестве способа сокращения, касающегося индивидуально каждого отдельного значения, попадающего в диапазон, если в этом документе не указано иное, и каждое отдельное значение включается в описание изобретения, как если бы оно было индивидуально описано в этом документе. Все способы, описанные в этом документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если в этом документе не указано иное или иначе не опровергается ясно контекстом. Использование любого и всех примеров, или вводного слова (например «такой как»), предлагаемого в этом документе, предназначено только для лучшего освещения изобретения и не является ограничением объема изобретения, если не заявлено иное. Ни одно слово в описании изобретения не должно быть истолковано как указывающее какой-нибудь незаявленный элемент в качестве существенного в практике изобретения.

Композиция по изобретению

Авторами настоящего изобретения неожиданно было обнаружено, что посредством инокулирования и ферментации молочного субстрата со штаммом *Lactobacillus rhamnosus* в дополнение к стартовой культуре возможно придавать полученному молочному продукту приятный сливочный вкус без негативного влияния на консистенцию молочного продукта, время ферментации и постацилирование.

Усиленный сливочный вкус обнаруживали в молочных продуктах, приготовленных посредством процессов как мезофильной, так и термофильной ферментации в присутствии *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871, который был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) с номером доступа DSM32666.

Под термином «усиленный сливочный вкус» подразумевают, что содержание диацетила и/или ацетоина в продукте является повышенным и/или что сливочный вкус продукта, который определяется по сенсорной шкале, является усиленным по сравнению с продуктом, который не содержит штамм *Lactobacillus rhamnosus* согласно настоящему изобретению.

Без ограничения теорией, можно предположить, что усиленный сливочный вкус, придаваемый молочному продукту штаммом *Lactobacillus rhamnosus* согласно настоящему изобретению, обусловлен усиленным продуцированием диацетила и/или ацетоина штаммом *Lactobacillus rhamnosus*.

Молочный продукт в предпочтительных воплощениях представляет собой ферментированный молочный продукт пониженной жирности/обезжиренный или сыр, который по существу испытывает недостаток сливочного вкуса, когда штамм *Lactobacillus rhamnosus* согласно настоящему изобретению не применялся в ферментации.

В конкретном воплощении изобретения композиция содержит по меньшей мере одну дополнительную молочнокислую бактерию.

В конкретном воплощении композиции по изобретению дополнительная молочнокислая бактерия представляет собой по меньшей мере одну противогрибковую молочнокислую бактерию, выбранную из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus*, штамма *Lactobacillus fermentum*, штамма *Lactobacillus paracasei*, штамма *Lactobacillus plantarum*, штамма *Propionibacterium freudenreichii*, например *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, штамма *Propionibacterium thoenii*, штамма *Propionibacterium jensenii*, штамма *Pediococcus acidilactici*, штамма *Enterococcus faecium*, штамма *Lactococcus lactis* и *Lactobacillus amylovorus*. В этом воплощении композиция является подходящей для использования в добавлении вместе со стартовой культурой к молочному субстрату в процессе приготовления молочного продукта, такого как ферментированный молочный продукт, например йогурт или сметана, или сыр, в начале ферментации с целью повышения содержания диацетила и/или для получения противогрибкового эффекта в ферментированном продукте или сыре. Альтернативно, композиция может быть добавлена во время процесса ферментации, то есть после начала и перед концом ферментации.

В конкретном воплощении композиции по изобретению по меньшей мере одна противогрибковая молочнокислая бактерия представляет собой штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15860, который был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) с номером доступа: 32092.

В конкретном воплощении изобретения композиция содержит стартовую культуру для приготовления ферментированного молочного продукта, содержащую один или более штаммов, выбранных из группы, состоящей из родов *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*.

Обычно такая композиция содержит бактерии в концентрированной форме, включая замороженные, сушеные или лиофилизированные концентраты, обычно имеющие концентрацию жизнеспособных клеток, которая находится в диапазоне от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующих единиц) на грамм композиции, включающую по меньшей мере 10^4 КОЕ на грамм композиции, такую как по меньшей мере 10^5 КОЕ/г, например по меньшей мере 10^6 КОЕ/г, такую как по меньшей мере 10^7 КОЕ/г, например по меньшей мере 10^8 КОЕ/г, такую как по меньшей мере 10^9 КОЕ/г, например по меньшей мере 10^{10} КОЕ/г, такую как по меньшей мере 10^{11} КОЕ/г. Таким образом, антимикробная композиция по изобретению предпочтительно присутствует в замороженной, сухой или лиофилизированной форме, например в виде культуры «для прямого внесения» (DVS). Однако при использовании в этом документе антимикробная композиция также может представлять собой жидкость, которая получена после суспендирования замороженных, сухих или лиофилизированных концентратов клеток в жидкой среде, такой как вода или буфер ФСБ. Когда антимикробная композиция по изобретению представляет собой суспензию, концентрация жизнеспособных клеток находится в диапазоне от 10^4 до 10^{12} КОЕ (колониеобразующих единиц) на мл композиции, включая по меньшей мере 10^4 КОЕ на мл композиции, такую как по меньшей мере 10^5 КОЕ/мл, например по меньшей мере 10^6 КОЕ/мл, такую как по меньшей мере 10^7 КОЕ/мл, например по меньшей мере 10^8 КОЕ/мл, такую как по меньшей мере 10^9 КОЕ/мл, например по меньшей мере 10^{10} КОЕ/мл, такую как по меньшей мере 10^{11} КОЕ/мл.

Композиция может дополнительно содержать в качестве дополнительных компонентов криопротекторы и/или обычные добавки, включающие питательные вещества, такие как экстракты дрожжей, сахара и витамины, например витамин А, С, D, К или витамины семейства витаминов В. Подходящие криопротекторы, которые могут быть добавлены к композициям по изобретению, представляют собой компоненты, которые улучшают холодостойкость микроорганизмов, такие как маннит, сорбит, натрия

триполифосфат, ксилит, глицерин, раффинозу, мальтодекстрин, эритрит, треит, трегалозу, глюкозу и фруктозу. Другие добавки могут включать углеводы, корригенты, минералы, ферменты (например сычужный фермент, лактазу и/или фосфолипазу).

Поскольку в процессах ферментации молочнокислых бактерий является нормальным использование смешанной культуры в качестве стартовой культуры, композиция в некоторых воплощениях будет содержать множество штаммов принадлежащих либо одному и тому же виду, или принадлежащих разным видам. Типичный пример такой полезной комбинации молочнокислых бактерий в термофильной стартовой культуре представляет собой смесь штамма *Lactobacillus bulgaricus* и штамма *Streptococcus thermophilus*. Типичный пример такой полезной комбинации молочнокислых бактерий в мезофильной стартовой культуре представляет собой смесь штамма *Lactococcus lactis* в комбинации со штаммом, выбранным из группы, состоящей из штамма *Leuconostoc*, штамма *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* и штамма *Streptococcus thermophilus*.

В предпочтительном воплощении настоящего изобретения стартовая культура представляет собой термофильную стартовую культуру, и композиция является подходящей для термофильной ферментации.

В другом предпочтительном воплощении стартовую культуру выбирают из группы, состоящей из родов *Streptococcus* и *Lactobacillus*. Стартовая культура в предпочтительном воплощении содержит по меньшей мере один штамм *Lactococcus lactis*. Стартовая культура может содержать любой штамм *Lactococcus lactis*, известный в данной области техники, такой как штаммы из *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* или *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. В еще одном предпочтительном воплощении стартовая культура содержит штамм *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* и штамм *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Композицию можно применять для получения молочного продукта с усиленным сливочным вкусом.

В предпочтительном воплощении молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт, такой как йогурт. В еще одном предпочтительном воплощении молочный продукт представляет собой сыр.

В предпочтительном воплощении молочный продукт содержит по меньшей мере $1,0 \text{ млн}^{-1}$ диацетила, конкретно по меньшей мере $3,0 \text{ млн}^{-1}$ диацетила, более конкретно по меньшей мере $5,0 \text{ млн}^{-1}$ диацетила, более конкретно по меньшей мере $7,0 \text{ млн}^{-1}$ диацетила, более конкретно по меньшей мере $9,0 \text{ млн}^{-1}$ диацетила, более конкретно по меньшей мере

11,0 млн⁻¹ диацетила, более конкретно по меньшей мере 13,0 млн⁻¹ диацетила, более конкретно по меньшей мере 15,0 млн⁻¹ диацетила, более конкретно по меньшей мере 17,0 млн⁻¹ диацетила и наиболее конкретно по меньшей мере 19,0 млн⁻¹ диацетила.

Специалисту известны многочисленные способы для определения содержания диацетила в молочных продуктах по изобретению. Например, содержание может быть определено посредством подходящих хроматографических способов, таких как статическая парофазная газовая хроматография (HSGC). Выделение диацетила может быть определено с использованием разных анализов, известных в данной области техники, но предпочтительно определяют в анализе, включающем:

1) получение ферментированного молочного продукта посредством:

а) инокулирования молока с помощью *Lactobacillus rhamnosus* в концентрации по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/г и с помощью стартовой культуры,

б) ферментации до достижения целевого pH, например pH 4,6, и;

2) хранение ферментированного молочного продукта при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 14 суток;

3) добавление 200 мкл 4 н H_2SO_4 к 1 грамму ферментированного молочного продукта и определение концентрации диацетила посредством статической парофазной газовой хроматографии.

Противогрибковая композиция по изобретению

В конкретном воплощении композиция по изобретению представляет собой противогрибковую композицию, содержащую *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 по изобретению и по меньшей мере одну дополнительную противогрибковую молочнокислую бактерию.

В предпочтительном воплощении композиции по изобретению используют против грибов, таких как дрожжи и плесневые грибы. Это значит, что композиции применяют для подавления и/или предотвращения роста грибов, которые служат причиной загрязнения в процессах молочной промышленности, в частности в процессах ферментации молока. Композиции по настоящему изобретению можно применять, например, для подавления и/или предотвращения роста дрожжей, таких как дрожжи родов *Kluyveromyces* (например, *K. marxianus*, *K. lactis*), *Pichia* (например *P. fermentans*), *Yarrowia* (например, *Y. lipolytica*), *Candida* (например, *C. sake*), *Debaryomyces* (например, *D. hansenii*) и подобных; или плесневых грибов, таких как плесневые грибы родов *Penicillium* (например, *P. nalgiovense*, *P. commune*, *P. crustosum*, *P. brevicompactum*, *P. glabrum*), *Mucor* spp., *Cladosporium* spp., *Aspergillus* (например, *A. versicolor*) и подобных. Особенно предпочтительно применять композиции по изобретению для подавления и/или предупреждения роста видов

Kluyveromyces marxianus, *Yarrowia lipolytica*, *Penicillium nalgiovense*, *Cladosporium* ssp., *Penicillium commune*, *Mucor* ssp., *Penicillium brevicompactum*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium crustosum*, *Kluyveromyces lactis* и/или *Debaryomyces hansenii*.

В конкретном воплощении изобретения противогрибковая активность штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 может быть определена как способность подавлять рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного с номером доступа DSM32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного с номером доступа DSM32094, или рост *Penicillium crustosum*.

В контексте настоящего изобретения способность подавлять рост гриба *Penicillium solitum*, депонированного с номером доступа DSM32093, или рост гриба *Penicillium brevicompactum*, депонированного с номером доступа DSM32094, предпочтительно определяют с использованием анализа, включающего:

- 1) получение ферментированного молочного продукта путем:
 - а) инокулирования молока с помощью *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 в концентрации по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/г и с помощью стартовой культуры,
 - б) ферментации до достижения целевого pH, например pH 4,6, и
 - в) затвердевания ферментированного молока посредством добавления агара;
- 2) получение по меньшей мере одного пятна *P. solitum* или *P. brevicompactum* на затвердевшем от агара ферментированном молоке с концентрацией 500 спор/пятно и инкубацию его в течение 7 суток при 25°C;

- 3) определение процента подавления путем определения максимального диаметра колонии, образованной в результате роста *P. solitum* или *P. brevicompactum*, и выражение диаметра в виде процента от максимального диаметра, образованного в таких же условиях, но в отсутствие штамма *Lactobacillus rhamnosus*.

В конкретном воплощении изобретения противогрибковую активность штамма *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 определяют как способность подавлять рост одних или более дрожжей, выбранных из группы, состоящей из *Torulaspora delbrueckii*, *Cryptococcus fragicola*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Pichia quilliermondii* и *Candida* spp, предпочтительно одних или более дрожжей, выбранных из группы, состоящей из *Torulaspora delbrueckii*, *Cryptococcus fragicola*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* и *Rhodotorula mucilaginosa*.

В контексте настоящего изобретения способность подавлять рост одних или более дрожжей, выбранных из группы, состоящей из *Torulaspora delbrueckii*, *Cryptococcus*

fragicola, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* и *Rhodotorula mucilaginosa* предпочтительно определяют с использованием анализа, включающего:

- 1) получение ферментированного молочного продукта путем:
 - а) инокулирования молока с помощью *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 в концентрации по меньшей мере 5×10^6 КОЕ/г и с помощью стартовой культуры,
 - б) ферментации до достижения целевого pH, например pH 4,6, и
 - в) затвердевания ферментированного молока посредством добавления агара;
- 2) получение по меньшей мере по одному пятну от четырех дрожжей *Torulaspora delbrueckii*, *Cryptococcus fragicola*, *Debaryomyces hansenii* и *Yarrowia lipolytica* на затвердевшем от агара ферментированном молоке в концентрациях 10^3 , 10^2 и 10^1 КОЕ/пятно и инкубацию их в течение 27 суток при 7°C;
- 3) определение процента подавления путем определения количества 12 пятен, где имеет место рост (от 0 до 12 пятен) для чашки, содержащей *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 со стартовой культурой и выражение количества в виде процента от количества пятен, когда имеет место рост для чашки, содержащей только стартовую культуру.

В альтернативном воплощении стадию (3) выполняют в виде качественного определения путем визуального осмотра и сравнения чашек и оценивания уровня подавления путем сравнения чашек с учетом 1) количества пятен с отсутствием роста и 2) уровня роста для пятен с ростом (диаметр, плотность и толщина пятна).

Применение согласно изобретению

Как сказано выше, изобретение дополнительно относится к применению композиции по изобретению для получения молочного продукта.

В конкретном воплощении молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт. В конкретном воплощении ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт. В еще одной конкретном воплощении молочный продукт представляет собой сыр.

В конкретном воплощении молочный продукт содержит по меньшей мере $0,75 \text{ млн}^{-1}$ диацетила, в частности по меньшей мере $1,5 \text{ млн}^{-1}$ диацетила.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению композиции по изобретению для продуцирования диацетила в процессе получения молочного продукта.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению композиции по изобретению для подавления роста грибов в процессе получения молочного продукта. Настоящее изобретение дополнительно относится к применению композиции по

изобретению для подавления роста дрожжей в процессе получения молочного продукта.

Способ по изобретению

Как указано выше, один аспект изобретения относится к способу изготовления молочного продукта со сливочным вкусом, включающему:

- а) инокуляцию молочного субстрата с помощью композиции согласно первому аспекту изобретения;
- б) ферментацию молочного субстрата;
- в) возможно, добавление дополнительных микроорганизмов и/или добавок к молочному субстрату;
- г) возможно, последующую обработку молочного субстрата; и
- д) возможно, упаковку молочного продукта.

Как описано выше, молочный субстрат для использования на стадии (а) может представлять собой любое сырье из сырого и/или переработанного молока, которое может быть подвергнуто ферментации согласно способу по изобретению.

Молочный субстрат может быть инокулирован указанной выше композицией посредством любого подходящего способа. Например, молочный субстрат может быть инокулирован путем прямой инокуляции в ферментационный чан.

В одном предпочтительном воплощении стадия (б) включает ферментацию молочного субстрата при температуре выше примерно 37°C, предпочтительно при температуре от примерно 38°C до примерно 45°C и более предпочтительно от примерно 39°C до примерно 42°C. В еще одном предпочтительном воплощении стадия (б) включает ферментацию молочного субстрата при температуре от примерно 22°C до примерно 34°C, более предпочтительно от примерно 24°C до примерно 32°C и более предпочтительно от примерно 26°C до примерно 30°C.

Процессы ферментации, применяемые в получении молочных продуктов, хорошо известны, и специалисту в данной области техники будет понятно, как выбирать подходящие условия процесса, такие как температура, кислород, количество и характеристики микроорганизма(ов) и длительность процесса. Очевидно, что условия ферментации выбирают таким образом, чтобы получать ферментированный молочный продукт, подходящий для получения молочного продукта с улучшенным вкусом и особой консистенцией.

Дополнительные микроорганизмы и/или добавки могут быть добавлены к молочному субстрату до, во время или после ферментации молочного субстрата на стадии (б). Микроорганизмы, которые могут быть добавлены к молочным субстратам, будут

обогащать благоприятным образом свойства молочного продукта. Например, микроорганизм может улучшать или поддерживать продуцирование диацетила, вязкость, жесткость геля, обволакивание полости рта, вкус, постацилирование и/или скорость ацилирования в молочном продукте. Возможно, другие ингредиенты могут быть добавлены к молочному субстрату, такие как красители, стабилизаторы, например, пектин, крахмал, модифицированный крахмал, СМС (карбоксиметилцеллюлоза), и так далее; или полиненасыщенные жирные кислоты, например омега-3 жирные кислоты. Такие ингредиенты могут быть добавлены в любой момент во время процесса производства, например до или после ферментации.

Молочный субстрат может быть впоследствии дополнительно обработан любым способом, необходимым для производства желаемого молочного продукта. Например, к молочному субстрату могут быть добавлены дополнительные компоненты, такие как обычные добавки, включая питательные вещества, такие как сахара и витамины. Кроме того, молочный субстрат может быть, например, гомогенизирован или обработан нагреванием, то есть пастеризован.

Молочный продукт может быть упакован любым подходящим способом, известным в данной области техники. Например, молочный продукт может быть упакован в герметичный контейнер, имеющий объем в диапазоне, например, от 25 до 1500 мл. Продукт может быть упакован в любой момент во время процесса производства, например упакован вслед за стадией инокулирования и затем ферментироваться в упаковке.

Молочные продукты, получаемые посредством способа, в качестве типичных примеров включают продукты, такие как йогурт, сметана, сыр и пахта.

Молочный продукт, получаемый посредством указанного выше способа, также представляет собой часть настоящего изобретения.

В предпочтительном воплощении молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт. «Ферментированный молочный продукт» при использовании в этом документе включает, но без ограничения продукты, такие как термофильные ферментированные молочные продукты, например йогурт, мезофильные ферментированные молочные продукты, например сметану и пахту, а также ферментированную сыворотку.

Термин «термофильный ферментированный молочный продукт» относится к ферментированным молочным продуктам, полученным путем термофильной ферментации термофильной стартовой культуры, и включает такие ферментированные

молочные продукты как термостатный йогурт, резервуарный йогурт и питьевой йогурт, например Якульт.

Термин «мезофильный ферментированный молочный продукт» относится к ферментированным молочным продуктам, полученным путем мезофильной ферментации мезофильной стартовой культуры, и включают такие ферментированные молочные продукты, как пахта, простокваша, густая простокваша, сметана, кислые густые сливки и мягкий сыр, такой как кварк, творог и сливочный сыр.

В еще одном предпочтительном воплощении молочный продукт представляет собой сыр, такой как зерненный творог, фета, чеддер, пармезан, моцарелла, эмменталь, данбо, гауда, эдам, сыр типа фета, голубой сыр, рассольный сыр, камамбер или бри.

В предпочтительном воплощении молочный продукт содержит по меньшей мере $0,75 \text{ млн}^{-1}$ диацетила, в частности по меньшей мере $1,0 \text{ млн}^{-1}$ диацетила, в частности по меньшей мере $1,5 \text{ млн}^{-1}$ диацетила.

Штамм CHCC15871 по изобретению

Пятый аспект изобретения относится к штамму *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871, который был депонирован в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) с номером доступа DSM 32666. Помимо этого штамма, изобретение также имеет отношение к мутантам, которые были получены из него, то есть они были получены посредством использования депонированного штамма CHCC15871 в качестве материнского штамма. Мутантный штамм может быть получен из CHCC15871, например, посредством генной инженерии, облучения, УФ-излучения, химической обработки и/или способов, которые индуцируют изменения в геноме. По существу, мутант согласно изобретению будет иметь такие же характеристики, как материнский штамм, если говорить об уровнях продуцирования ацетата, ацетальдегида, диацетила и/или ацетоина. Предпочтительно, чтобы мутант продуцировал по существу по меньшей мере 80% или более, по меньшей мере 90% или более, по меньшей мере 95% или более, или по меньшей мере 100% или более ацетата, ацетальдегида, диацетила и/или ацетоина по сравнению с его материнским штаммом.

В данном контексте выражение «такое же или более высокое продуцирование диацетила по сравнению с материнским штаммом» означает по меньшей мере 100% продуцирование диацетила по сравнению с материнским штаммом.

Специалисту ясно, что посредством использования депонированного штамма в качестве материнского штамма, квалифицированный специалист может посредством обычного мутагенеза или техник реизоляции согласно имеющейся практике получать

дополнительные мутанты или их производные, которые сохраняют описанные в этом документе значимые признаки и преимущества. Таким образом, термин первого аспекта «его мутант» относится к мутантным штаммам, полученным посредством применения депонированного штамма в качестве материнского штамма.

Воплощения настоящего изобретения описываются ниже с помощью неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Полуколичественный анализ продуцирования диацетила и ингибирующего действия *Lb. rhamnosus* CHCC15871 против различных дрожжей и плесневых загрязнителей

Для полуколичественного анализа ингибирующего действия *Lb. rhamnosus* CHCC15871 применяли анализ с агаром, имеющий сходство с процессом изготовления и производством йогурта.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% масс./об.) подвергали тепловой обработке при $90\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин и сразу же охлаждали. Имеющуюся в продаже стартовую культуру для йогурта (F-DVSYoFlex Mild 2.0) инокулировали в концентрации 0,02% (об./масс.) и инокулированное молоко распределяли в бутылки 200 мл. Одну бутылку инокулировали при помощи *Lb. rhamnosus* CHCC15871 в суммарной концентрации 1×10^7 КОЕ/г, одну бутылку инокулировали при помощи *Lb. rhamnosus* CHCC12483, имеющимся в продаже биозащитным штаммом (полученным от Holdbac® YM-B), в суммарной концентрации 1×10^7 КОЕ/г, одну бутылку инокулировали при помощи сравнительного штамма *Lb. rhamnosus* с противогрибковой активностью и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали только стартовой культурой. Все бутылки инкубировали в водяной бане при $43\pm 1^\circ\text{C}$ и ферментировали в этих условиях до достижения pH $4,60\pm 0,1$. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Затем ферментированное молоко нагревали до температуры 40°C и добавляли 40 мл 5% стерильного раствора агара, который был расплавлен и охлажден до 60°C . Этот раствор ферментированного молока и агара затем разливали в стерильные чашки Петри и чашки сушили на столе в ламинарном боксе в течение 30 мин.

Суспензию спор трех разных видов плесневых грибов *Penicillium brevicompactum* (DSM32094), *P. crustosum*, *P. solitum* (DSM32093) наносили пятнами в концентрации 500 спор/пятно. Три вида плесневых гриба наносили пятнами на одну и ту же чашку. Чашки инкубировали при $25\pm 1^\circ\text{C}$ и периодически осматривали на наличие роста плесневых

грибов. Пять видов дрожжей, включая *Torulaspora delbrueckii*, *Cryptococcus fragicola*, *Debaryomyces hansenii*, *Yarrowia lipolytica* и *Rhodotorula mucilaginosa* наносили пятнами в концентрациях 10^3 , 10^2 и 10^1 КОЕ/пятно. Чашки инкубировали при $7\pm 1^\circ\text{C}$ и периодически осматривали на наличие роста дрожжей.

На 14 сутки образцы анализировали на наличие диацетила посредством статической парофазной газовой хроматографией (HSGC), чувствительного способа анализа летучих веществ в сложных матрицах. Установка состояла из статического парофазного дозатора, соединенного с газовым хроматографом с детектором по ионизации в пламени (FID). Для этой цели использовали следующее оборудование:

HS-автодозатор: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

HS-программа: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

GC-программа: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Колонка: HP-FFAP 25 м x 0,20 мм x 0,33 мкм, Agilent Technologies

Стандарты с известной концентрацией использовали для определения факторов отклика (калибровка), контроли использовали для контроля того, чтобы используемые факторы отклика были стабильны в аналитических сериях, а также в промежуточных сериях и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн^{-1}) в образцах и контролях определяли с использованием факторов отклика, исходя из стандартов. Образцы готовили путем добавления 200 мкл 4н H_2SO_4 к 1 г образца йогурта и сразу же анализировали посредством HSGC.

Влияние на продуцирование диацетила проиллюстрировано на Фиг. 1, показывая, что при добавлении *Lb. rhamnosus* CHCC15871 во время ферментации молока продуцируются значительно более высокие уровни диацетила по сравнению с имеющимся в продаже штаммом *Lb. rhamnosus*.

Влияние на продуцирование ацетоина проиллюстрировано на Фиг. 2, показывая, что при добавлении *Lb. rhamnosus* CHCC15871 во время ферментации молока продуцируются значительно более высокие уровни ацетоина по сравнению с имеющимся в продаже штаммом *Lb. rhamnosus*.

На Фиг. 3 показан рост дрожжей на подготовленных чашках с молоком, ферментированным только с одной стартовой культурой (контроль, первая чашка), вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC12483 (вторая чашка) или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871 (третья чашка). Чашки инкубировали при $7\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 27 суток. Загрязнители-мишени добавляли в концентрациях 1×10^3 КОЕ/пятно (верхний ряд), 1×10^2 КОЕ/пятно (средний

ряд) и 1×10^1 КОЕ/пятно (нижний ряд): (A) *Torulaspora delbrueckii*, (B) *Cryptococcus fragicola*, (C) *Debaryomyces hansenii* и (D) *Yarrowia lipolytica*.

На Фиг. 4 показан рост дрожжей на подготовленных чашках с молоком, ферментированным только с одной стартовой культурой (контроль, первая чашка), вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC12483 (вторая чашка), вместе со сравнительным штаммом *Lb. rhamnosus* (третья чашка) или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871 (четвертая чашка). Чашки были инкубированы при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 26 суток. Загрязнитель-мишень, *Rhodotorula mucilaginosa*, добавляли в концентрациях 1×10^3 КОЕ/пятно (верхний ряд), 1×10^2 КОЕ/пятно (средний ряд) и 1×10^1 КОЕ/пятно (нижний ряд).

Как очевидно из результатов анализа дрожжей на агаре, представленных на Фиг. 3 и 4, тестируемые дрожжи очень хорошо росли на чашках с агаром, изготовленным с молоком, ферментированным только со стартовой культурой (контроль). Однако когда во время ферментации молока присутствовал *Lb. rhamnosus* CHCC15871, в полученных чашках подавлялся рост всех тестируемых дрожжей. Уровень подавления был даже более высоким, чем при подавлении, наблюдаемом для имеющегося в продаже биозащитного штамма, *Lb. rhamnosus* CHCC12483, и для сравнительного штамма *Lb.*

На Фиг. 5 показан рост плесневых грибов на подготовленных чашках с молоком, ферментированным только с одной стартовой культурой (контроль, первая чашка) или совместно с *Lb. rhamnosus* CHCC12483 (вторая чашка) или совместно с *Lb. rhamnosus* CHCC15871 (третья чашка). Чашки были инкубированы при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 12 суток (верхний ряд) или $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 27 суток (нижний ряд). Загрязнители-мишени добавляли в концентрациях 500 спор/пятно: (A) *Penicillium brevicompactum*, (B) *Penicillium crustosum* и (C) *Penicillium solitum*.

На Фиг. 5 показано, что все тестируемые плесневые грибы были способны расти на чашках с агаром, изготовленным с молоком, ферментированным только со стартовой культурой (контроль). Когда во время ферментации молока присутствовал *Lb. rhamnosus* CHCC12483, рост плесневых грибов подавлялся. Когда во время ферментации молока присутствовал *Lb. rhamnosus* CHCC15871, рост плесневых грибов подавлялся даже сильнее, чем для CHCC12483.

Пример 2: Влияние штамма *Lb. rhamnosus* CHCC15871 на постацилирование

Штамм *Lb. rhamnosus* (CHCC15871) тестировали в отношении действия скорости ацилирования и влияния на постацилирование.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% масс./об.) подвергали тепловой обработке при $90 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин и сразу же охлаждали.

Имеющуюся в продаже стартовую культуру для йогурта (F-DVS YoFlexMild 2.0) инокулировали в концентрации 0,02% (об./масс.) и инокулированное молоко распределяли в бутылки 200 мл. Одну бутылку инокулировали при помощи *Lb. rhamnosus* CHCC15871 в суммарной концентрации 1×10^7 КОЕ/г, одну бутылку инокулировали при помощи *Lb. rhamnosus* CHCC12483, имеющимся в продаже биозащитным штаммом (полученным от Holdbac® YM-B) в суммарной концентрации 1×10^7 КОЕ/г и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали только стартовой культурой. Все бутылки инкубировали в водяной бане при $43 \pm 1^\circ\text{C}$ и ферментировали при таких условиях до достижения pH $4,60 \pm 0,1$. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду.

Для наблюдения за влиянием на постацилирование три образца ферментированного молока (только закваска, *Lb. rhamnosus* CHCC12483 и *Lb. rhamnosus* CHCC15871) хранили при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 21 суток и pH измеряли на 1, 7, 14 и 21 сутки.

На Фиг. 6 показан профиль ацилирования ферментированных молочных продуктов во время ферментации при 43°C . Продукты ферментируют при помощи только стартовой культуры, контроля или стартовой культуры в комбинации со штаммами *Lb. rhamnosus* CHCC12483 или *Lb. rhamnosus* CHCC15871.

Как очевидно из Фиг. 6, ни один из двух штаммов *Lb. rhamnosus* при добавлении не изменял профиль ацилирования ферментации.

На Фиг. 7 показан рост pH (постацилирование) в ферментированных молочных продуктах в зависимости от времени при хранении при $7 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 21 суток. Продукты ферментируют при помощи только стартовой культуры, контроля или стартовой культуры в комбинации со штаммами *Lb. rhamnosus* CHCC12483 или *Lb. rhamnosus* CHCC15871.

Как очевидно из Фиг. 7, ни один из двух штаммов *Lb. rhamnosus* при добавлении не изменял свойства постацилирования ферментированных молочных продуктов в какой-либо значительной степени.

Пример 3: Полуколичественный анализ ингибирующего действия *Lb. rhamnosus* CHCC15871 против различных плесневых загрязнителей

Для полуколичественного анализа ингибирующего действия *Lb. rhamnosus* CHCC15871 применяли анализ с агаром, имеющий сходство с процессом изготовления и производством сметаны.

Гомогенизированное нормализованное молоко (9% жира масс./об.) подвергали тепловой обработке при $90 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин и сразу же охлаждали. Имеющуюся в

продаже стартовую культуру для сметаны (F-DVS XT-314) инокулировали в концентрации 0,02% (об./масс.) и инокулированное молоко распределяли в бутылки 200 мл. Одну бутылку инокулировали при помощи *Lb. rhamnosus* CHCC15871 в суммарной концентрации 5×10^6 КОЕ/г и одну бутылку использовали в качестве контроля и инокулировали при помощи только стартовой культуры. Обе бутылки инкубировали в водяной бане при $26 \pm 1^\circ\text{C}$ и ферментировали в таких условиях до достижения pH $4,60 \pm 0,1$. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. Затем ферментированное молоко нагревали до температуры 40°C и добавляли 40 мл 5% стерильного раствора агара, который был расплавлен и охлажден до 60°C . Этот раствор ферментированного молока и агара затем разливали в стерильные чашки Петри, и чашки сушили на столе в ламинарном боксе в течение 30 мин.

Суспензию спор трех разных плесневых грибов наносили пятнами в концентрации 500 спор/пятно; *Penicillium brevicompactum* (DSM32094), *P. crustosum* и *P. solitum* (DSM32093). Три плесневых гриба наносили пятнами на одну и ту же чашку. Чашки инкубировали при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ и периодически осматривали на наличие роста плесневых грибов.

На Фиг. 8 показан рост плесневых грибов на подготовленных чашках с молоком, ферментированным только с одной стартовой культурой (контроль, первая чашка) или вместе с *Lb. rhamnosus* CHCC15871 (вторая чашка). Чашки были инкубированы при $25 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 12 суток. Загрязнители-мишени добавляли в концентрации 500 спор/пятно: (A) *Penicillium brevicompactum*, (B) *Penicillium crustosum* и (C) *Penicillium solitum*.

На Фиг. 8 показано, что все тестируемые плесневые грибы были способны расти на чашках с агаром, изготовленным с молоком, ферментированным только со стартовой культурой (контроль). Когда во время ферментации молока присутствовал *Lb. rhamnosus* CHCC15871, рост плесневых грибов сильно подавлялся.

Пример 4: Влияние штамма *Lb. rhamnosus* CHCC15871 на продуцирование диацетила и ацетона, время ферментации и вязкость

Штамм *Lb. rhamnosus* (CHCC15871) тестировали в отношении влияния на продуцирование диацетила и ацетона, время ферментации и вязкость в случае применения сметаны. Характеристики сравнивали с обычным *Lb. rhamnosus* CHCC12697, как известно, имеющим высокое продуцирование по диацетилу, сравн. WO2012/136832, и противогрибковую активность, сравн. WO2012/136830.

Основу сметаны (18% жира и 2,7% масс./об. белка) гомогенизировали (две стадии 200/70 бар (20/7 МПа) при 70°C), подвергали тепловой обработке при 85±1°C в течение 3 мин и сразу же охлаждали. В пробном старте основу сметаны распределяли в стерильные бутылки 200 мл. Пять стартовых культур (SC1-SC5) - состоящих из *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus* и *Leuconostoc* - инокулировали в концентрации 0,01% (об./масс.). Каждой стартовой культурой инокулировали пять бутылок. Кроме того, две бутылки инокулировали при помощи *Lb. rhamnosus* CHCC15871 в суммарной концентрации 5 x 10⁶ КОЕ/г и другие две бутылки – при помощи *Lb. rhamnosus* CHCC12697 (база сравнения) в суммарной концентрации 5 x 10⁶ КОЕ/г. По одной бутылке с каждой стартовой культурой использовали в качестве эталона/контроля. Все бутылки инкубировали в водяной бане при 30±1°C и ферментировали в этих условия до достижения pH 4,50±0,1. При конечном pH сгусток перемешивали (20 раз с помощью ручной мешалки) для достижения гомогенной консистенции и охлаждали на льду. После охлаждения бутылки хранили при 5±1°C.

Зарегистрированное время ферментации показано на Фиг.9. Важно отметить, что комбинация со штаммами *Lb. rhamnosus* не вызывает значительного повышения времени ферментации. Для SC1, SC2, SC4 и SC5 время ферментации со смесями стартовой культуры и CHCC15871 было ниже, чем таковое для только одной стартовой культуры и стартовой культуры и CHCC12697.

На 7 и 21 сутки образцы анализировали в отношении диацетила и ацетоина посредством статической парофазной газовой хроматографии (HSGC), чувствительного способа анализа летучих веществ в сложных матрицах. Установка состояла из статического парофазного дозатора, соединенного с газовым хроматографом с детектором по ионизации в пламени (FID). Для этой цели использовали следующее оборудование:

HS-автодозатор: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer

HS-программа: HSControl v.2.00, Perkin Elmer

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer

GC-программа: Turbochrom navigator, Perkin Elmer

Колонка: HP-FFAP 25 м x 0,20 мм x 0,33 мкм, Agilent Technologies

Стандарты известной концентрации использовали для определения факторов отклика (калибровка), контроли использовали для контроля того, чтобы используемые факторы отклика были стабильны в аналитических сериях, а также в промежуточных сериях и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн⁻¹) в образцах и контролях определяли с использованием факторов отклика, исходя из стандартов.

Образцы получали путем добавления 200 мкл 4н H_2SO_4 к 1 грамму ферментированного образца сметаны и анализировали посредством HSGC.

Влияние на продуцирование диацетила показано на Фиг.10, а для ацетоина - на Фиг.11. На Фиг.10 показано, что добавление *Lb. rhamnosus* CHCC15871 во время ферментации имеет очень сильное влияние на количество продуцированного диацетила, особенно после 21 суток хранения в холодильнике, и, неожиданно, количества являются значительно более высокими по сравнению с образцами с *Lb. rhamnosus* CHCC12697. Кроме того, CHCC15871 также продуцирует более высокие уровни ацетоина по сравнению с CHCC12697, что показано на Фиг.11.

Через семь суток после получения ферментированный сметанный продукт доводили до 13°C и перемешивали вручную (20 раз) до гомогенности образца. Реологические свойства образца оценивали на реометре (Anton Paar Physica Rheometer с ASC, автоматическим устройством сены образцов, Anton Paar® GmbH, Austria) посредством использования стаканчика с поплавком. Реометр настраивали на постоянную температуру 13°C в течение времени измерения. Настройки были следующие:

Время выдержки (до восстановления в какой-то степени изначальной структуры): 5 минут без любой физической нагрузки (колебания или вращения), приложенной к образцу.

Стадия вращения (для измерения напряжения сдвига при 300 1/с)

Разработаны две стадии:

1) Скорость сдвига = [0,3-300] 1/с и 2) Скорость сдвига = [275-0,3] 1/с.

Каждая стадия включала 21 точку измерения за 210 с (каждые 10 с).

Напряжение сдвига в точке максимума (300 1/с) реологических кривых было рано для дополнительного анализа, так как было показано, что это значение хорошо коррелирует с консистенцией, ощущаемой во рту.

Напряжение сдвига (Па) представлено в виде Вязкость (Па*с)*Скорость сдвига (1/с).

На Фиг.12 показаны реологические результаты. Очевидно, добавление штаммов *Lb. rhamnosus* не имеет негативного влияния на свойства консистенции, выраженные посредством напряжения сдвига при скорости сдвига 300. Напряжение сдвига не снижается в сравнении с контрольными образцами (SC1–SC5).

Пример 5: Сравнение продуцирования диацетила *Lb. rhamnosus* CHCC15871 с различными штаммами *Lb. rhamnosus*

Продуцирование диацетила штаммом *Lb. rhamnosus* CHCC15871 с семью различными штаммами *Lb. rhamnosus*.

Гомогенизированное молоко с пониженным содержанием жира (1,5% масс./об.) подвергали тепловой обработке при $90 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 20 мин и сразу же охлаждали. Имеющуюся в продаже стартовую культуру для йогурта (F-DVS YoFlex Mild 2.0) инокулировали в концентрации 0,02% (об./масс.) и инокулированное молоко распределяли в бутылки 200 мл. 8 бутылок инокулировали при помощи штаммов *Lb. rhamnosus* (CHCC15871, CHCC12483, штамм 1, штамм 2, штамм 3, штамм 4, штамм 5 и штамм 6) в суммарной концентрации 1×10^7 КОЕ/г, один штамм на бутылку. Одну бутылку использовали в качестве эталона и инокулировали только при помощи стартовой культуры. Все бутылки инкубировали в водяной бане при $43 \pm 1^\circ\text{C}$ и ферментировали в этих условиях до достижения $\text{pH } 4,55 \pm 0,1$. После ферментации бутылки энергично встряхивали для разрушения сгустка и охлаждали на льду. После охлаждения образцы хранили при $7 \pm 1^\circ\text{C}$.

На 14 сутки образцы анализировали в отношении диацетила посредством статической парофазной газовой хроматографии (HSGC), чувствительного способа анализа летучих веществ в сложных матрицах. Установка состояла из статического парофазного дозатора, соединенного с газовым хроматографом с детектором по ионизации в пламени (FID). Для этой цели использовали следующее оборудование:

HS-автодозатор: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer

HS-программа: HSControl v.2.00, Perkin Elmer

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer

GC-программа: Turbochrom navigator, Perkin Elmer

Колонка: HP-FFAP 25 м x 0,20 мм x 0,33 мкм, Agilent Technologies

Стандарты известной концентрации использовали для определения факторов отклика (калибровка), контроли использовали для контроля того, чтобы используемые факторы отклика были стабильны в аналитических сериях, а также в промежуточных сериях и с течением времени (месяцы). Концентрацию летучих веществ (млн^{-1}) в образцах и контролях определяли с использованием факторов отклика, исходя из стандартов. Образцы получали путем добавления 200 мкл 4н H_2SO_4 к 1 г образца йогурта и сразу же анализировали посредством HSGC.

Влияние на продуцирование диацетила представлено на Фиг. 13, демонстрируя, что добавление семи разных штаммов *Lb. Rhamnosus* во время ферментации приводило к варьированию уровней диацетила, присутствовавшего в образцах после 14 суток

хранения. Наблюдаемые уровни варьировали от 6,3 млн⁻¹ до 20 млн⁻¹. Для сравнения, CHCC15871 продуцировал самое высокое количество диацетила.

ДЕПОНИРОВАНИЕ И ЭКСПЕРТНОЕ РЕШЕНИЕ

Заявитель испрашивает, чтобы образец депонированных микроорганизмов, указанных ниже, мог быть сделан доступным только для эксперта до даты выдачи патента.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871 был депонирован 17.10.2017 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124, Брауншвейг, с номером доступа DSM32666.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15860 был депонирован 16.07.2015 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124, Брауншвейг, с номером доступа DSM 32092.

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 был депонирован 01.03.2011 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124, Брауншвейг, с номером доступа DSM 24616.

Штамм *Penicillium solitum* CHCC16948 был депонирован 16.07.2015 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124, Брауншвейг, с номером доступа DSM 32093.

Штамм *Penicillium brevicompactum* CHCC16935 был депонирован 16.07.2015 в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124, Брауншвейг, с номером доступа DSM 32094.

Данные депонирования были сделаны согласно Будапештскому договору по международному признанию депонирования микроорганизмов для целей патентной процедуры.

ССЫЛКИ

Jyoti, B.D., Suresh, A.K., and Venkatesh, K.V. (2003): Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19: 509-514.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871, депонированный в немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) с номером доступа DSM 32666, или его мутантный штамм, где мутантный штамм получен посредством использования депонированного штамма в качестве материнского штамма, и где мутантный штамм имеет такое же или более высокое продуцирование диацетила по сравнению с материнским штаммом.

2. Композиция по п. 1, содержащая по меньшей мере одну дополнительную молочнокислую бактерию.

3. Композиция по п. 1 или 2, где дополнительная молочнокислая бактерия представляет собой по меньшей мере одну противогрибковую молочнокислую бактерию, выбранную из группы, состоящей из штамма *Lactobacillus rhamnosus*, штамма *Lactobacillus fermentum*, штамма *Lactobacillus paracasei*, штамма *Lactobacillus plantarum*, штамма *Propionibacteria freudenreichii*, штамма *Pediococcus acidilactici*, штамма *Enterococcus faecium* и штамма *Lactococcus lactis*.

4. Композиция по п. 3, где по меньшей мере одна противогрибковая молочнокислая бактерия представляет собой штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15860, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) с номером доступа 32092.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, содержащая стартовую культуру для приготовления ферментированного молочного продукта, содержащую один или более штаммов, выбранных из группы, состоящей из родов *Lactococcus*, *Streptococcus* и *Lactobacillus*.

6. Композиция по любому из пп. 1-5, которая содержит бактерии в форме, выбранной из группы, состоящей из замороженного, высушенного и лиофилизированного концентрата.

7. Применение композиции по любому из пп. 1-6 для получения молочного продукта.

8. Применение по п. 7, где молочный продукт представляет собой ферментированный молочный продукт.

9. Применение по п. 8, где ферментированный молочный продукт представляет собой йогурт.

10. Применение по п. 7, где молочный продукт представляет собой сыр.

11. Применение по любому из пп. 7-10, где молочный продукт содержит по

меньшей мере $0,75 \text{ млн}^{-1}$ диацетила.

12. Применение по п. 11, где молочный продукт содержит по меньшей мере $1,5 \text{ млн}^{-1}$ диацетила.

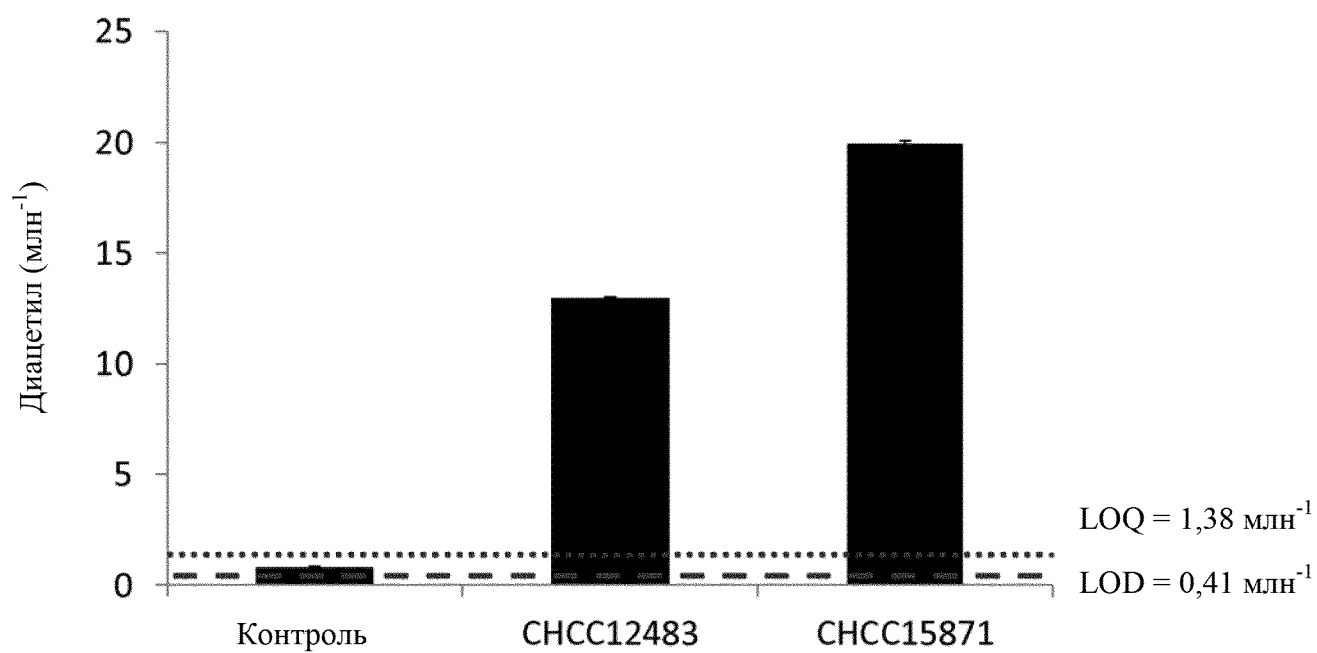
13. Способ получения молочного продукта, включающий:

- а) инокулирование молочного субстрата композицией по любому из пп. 1-5;
- б) ферментирование молочного субстрата;
- в) возможно, добавление дополнительных микроорганизмов и/или добавок к молочному субстрату;
- г) возможно, последующую обработку молочного субстрата; и
- д) возможно, упаковку молочного продукта.

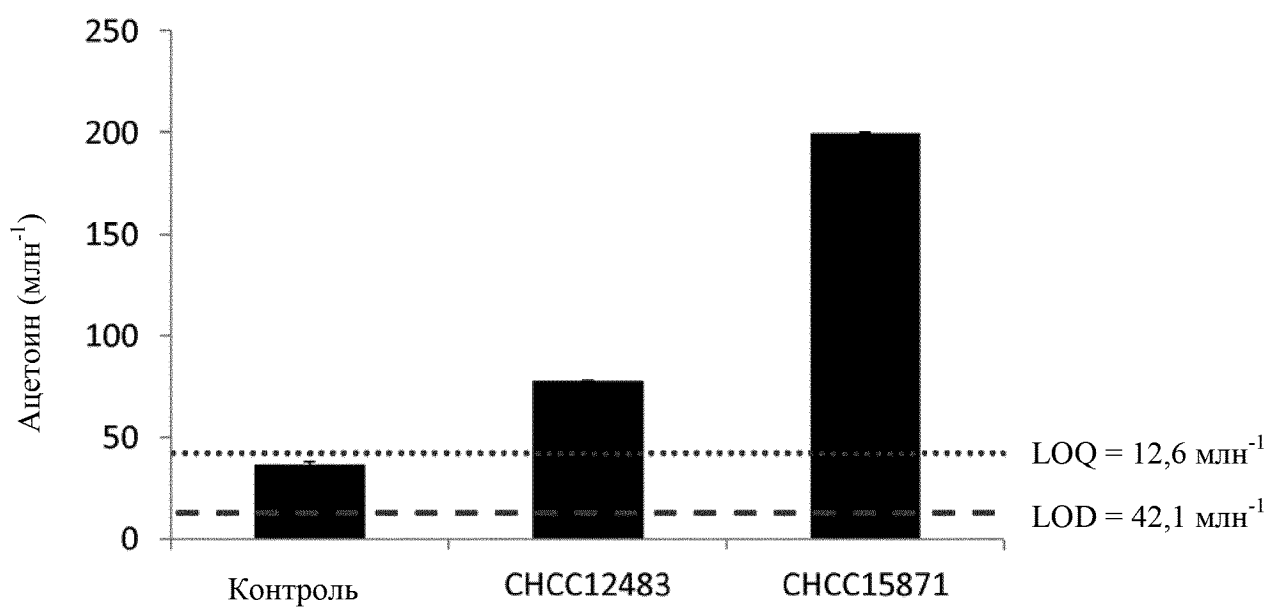
14. Способ по п. 13, где стадия (б) включает ферментирование молочного субстрата при температуре выше 35°C .

15. Штамм *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15871, депонированный в Немецкой коллекции микроорганизмов и клеточных культур (DSMZ) с номером доступа DSM 32666, или его мутантный штамм, где мутантный штамм получен путем использования депонированного штамма в качестве материнского штамма, и где мутантный штамм имеет такие же или улучшенные свойства в отношении продуцирования диацетила, как и материнский штамм.

LACTOBACILLUS RHAMNOSUS
С ПОВЫШЕННЫМ ПРОДУЦИРОВАНИЕМ
ПО ДИАЦЕТИЛУ

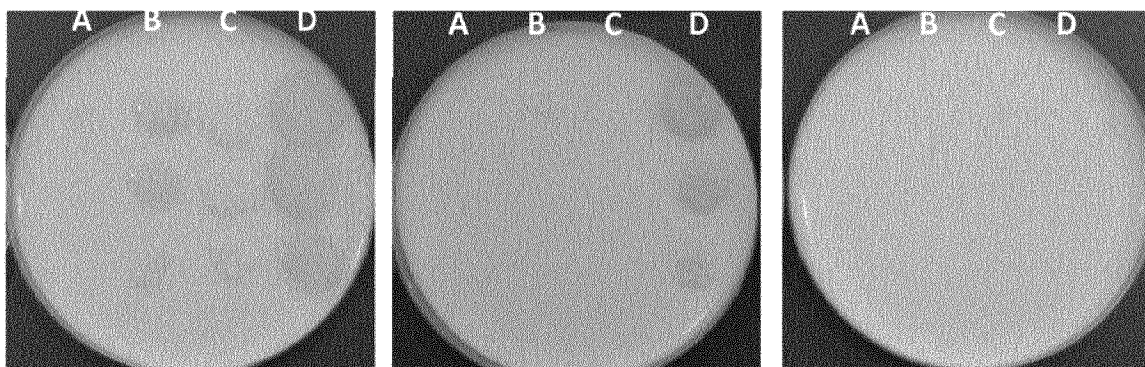


Фиг.1

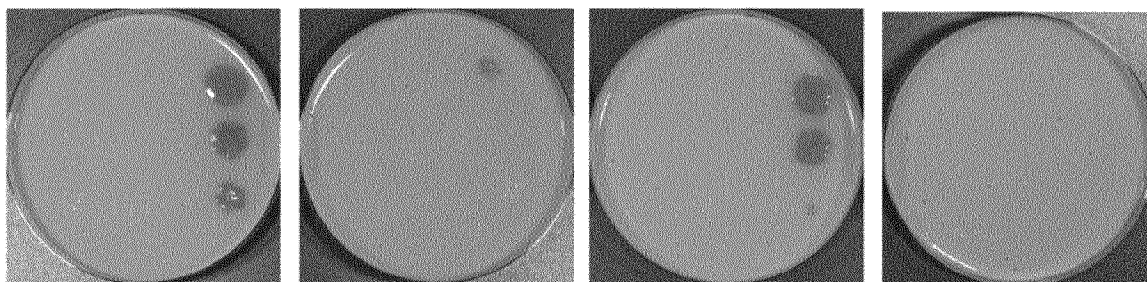


Фиг.2

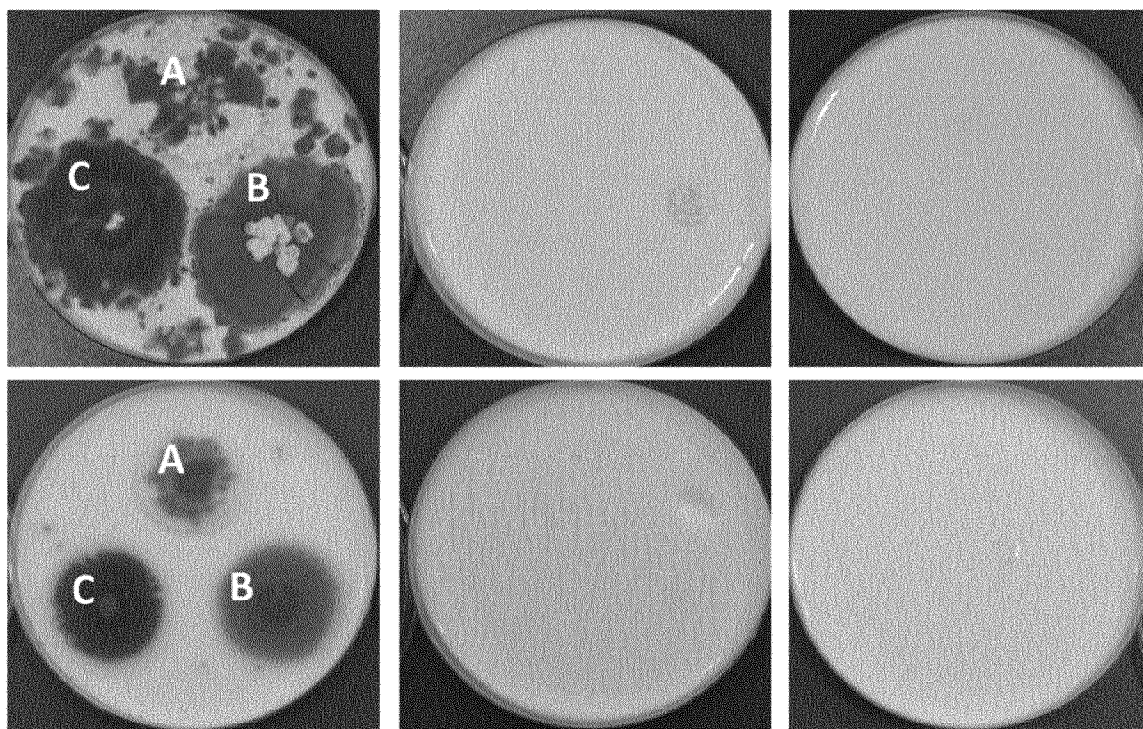
LACTOBACILLUS RHAMNOSUS
С ПОВЫШЕННЫМ ПРОДУЦИРОВАНИЕМ
ПО ДИАЦЕТИЛУ



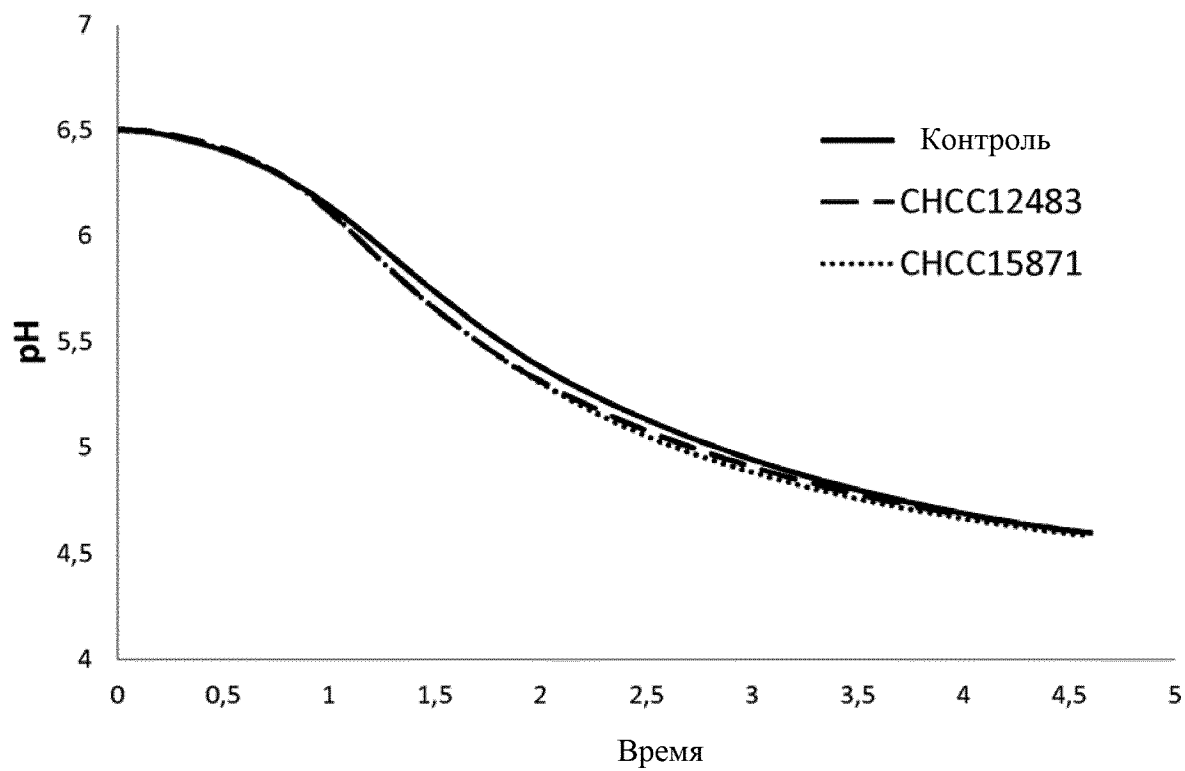
Фиг. 3



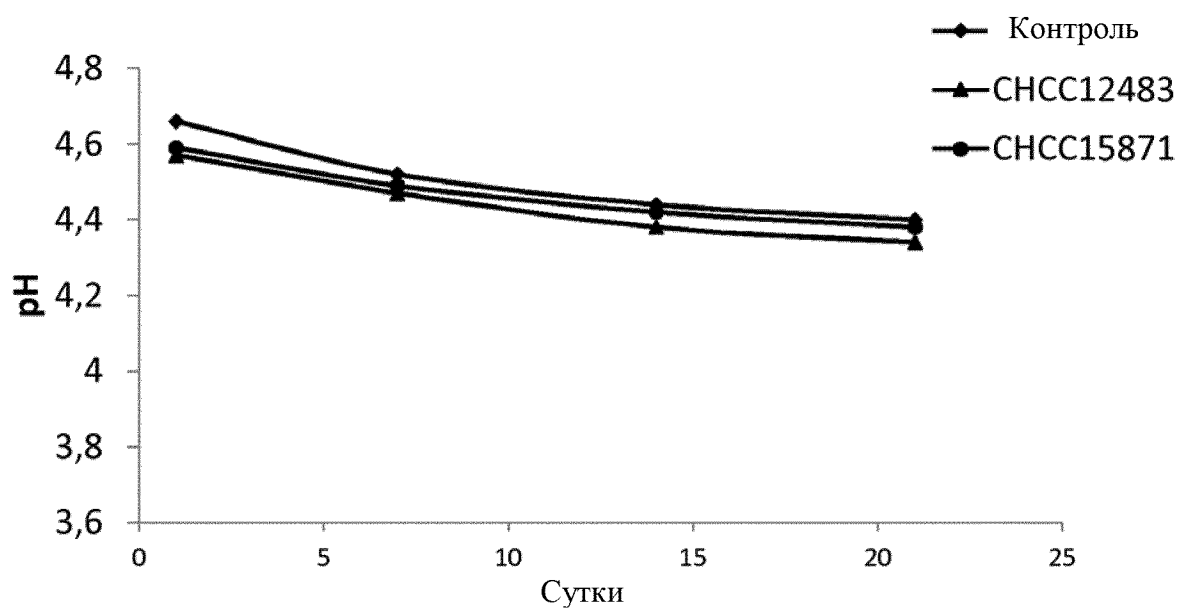
Фиг. 4



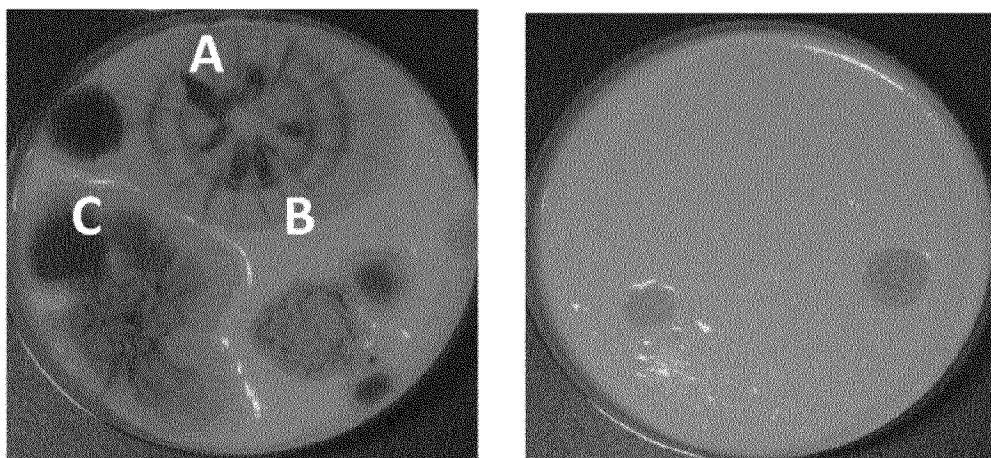
Фиг. 5



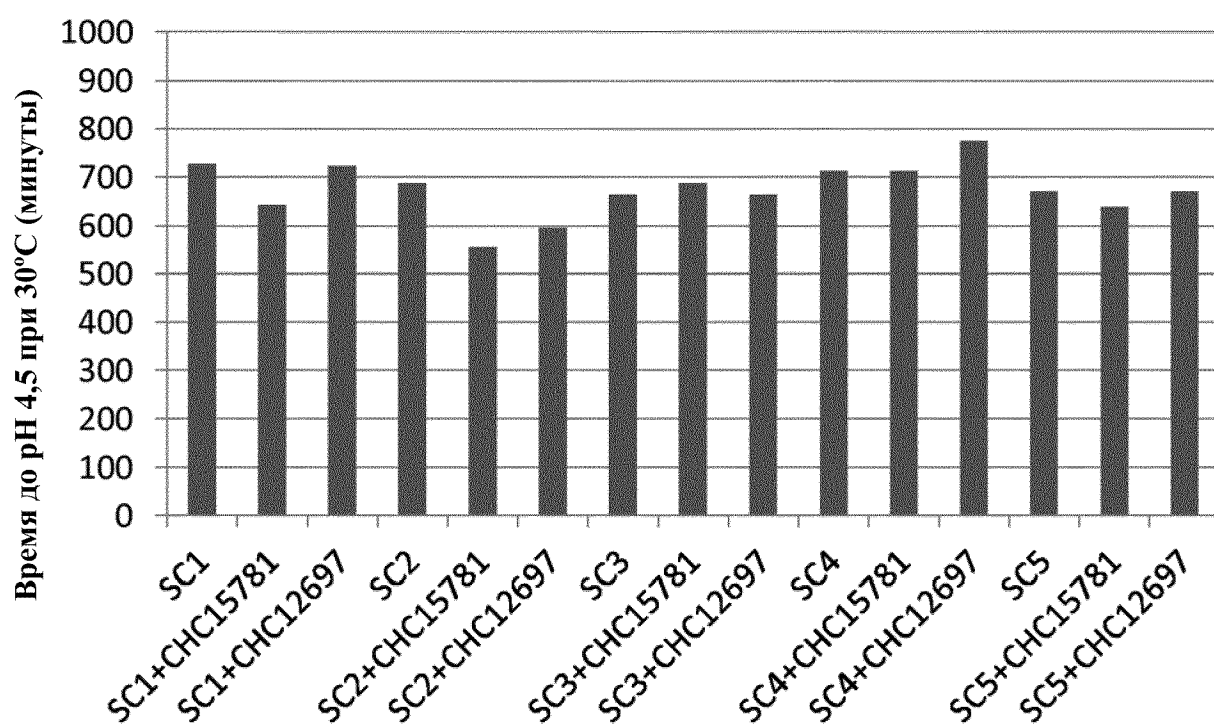
Фиг. 6



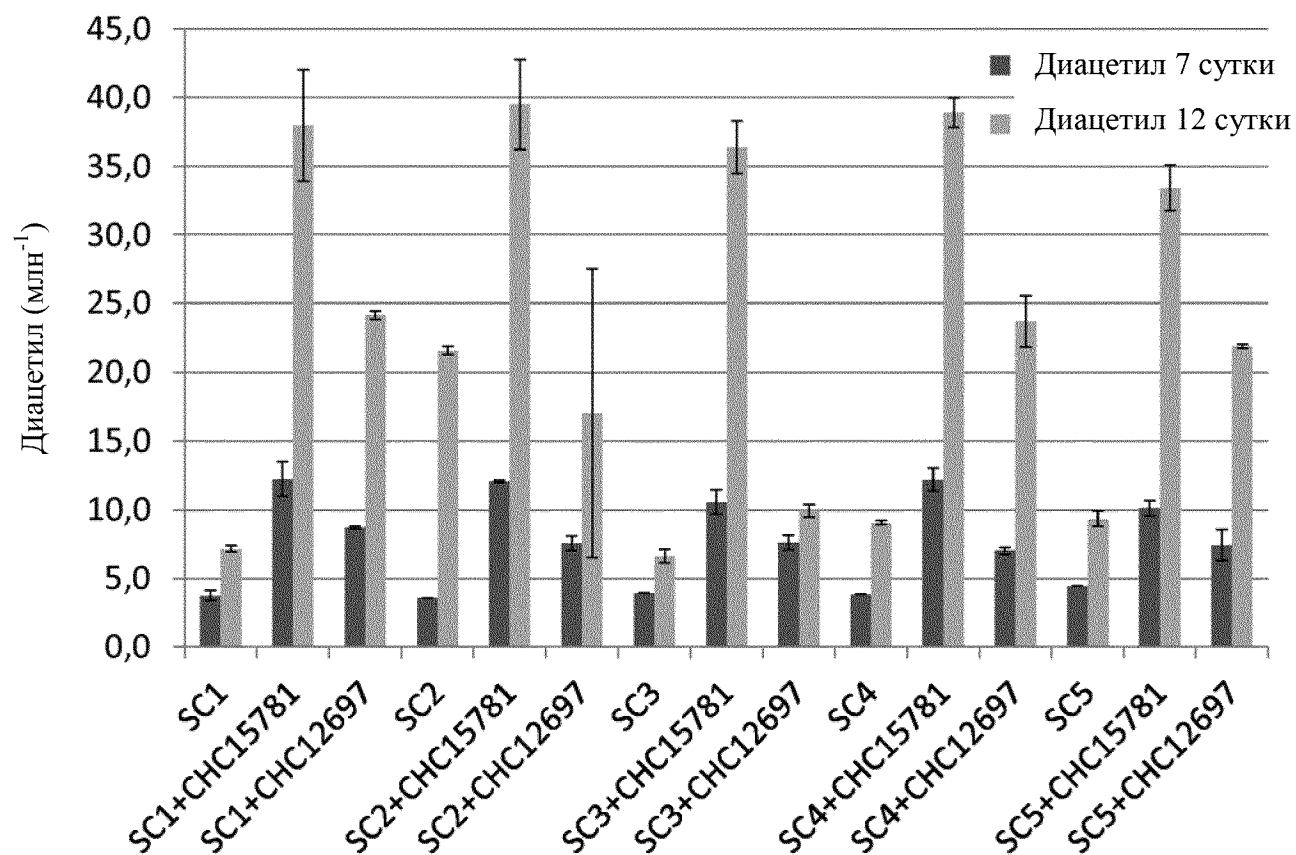
Фиг. 7



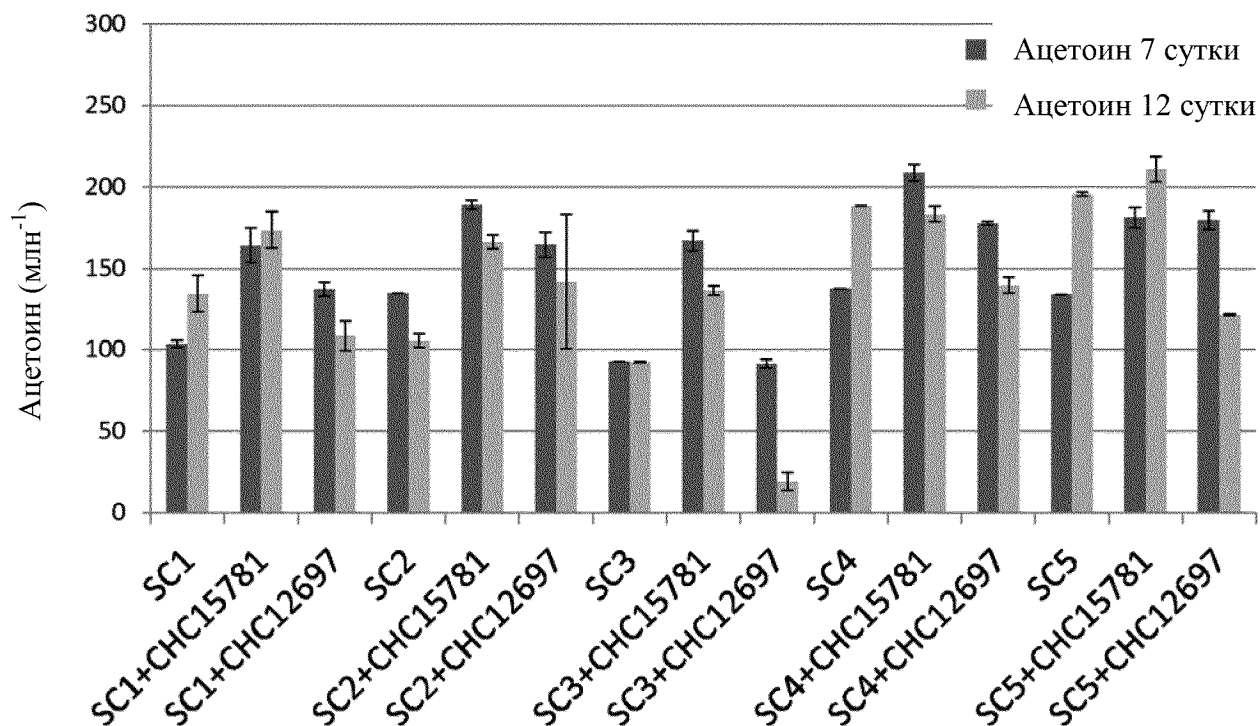
Фиг. 8



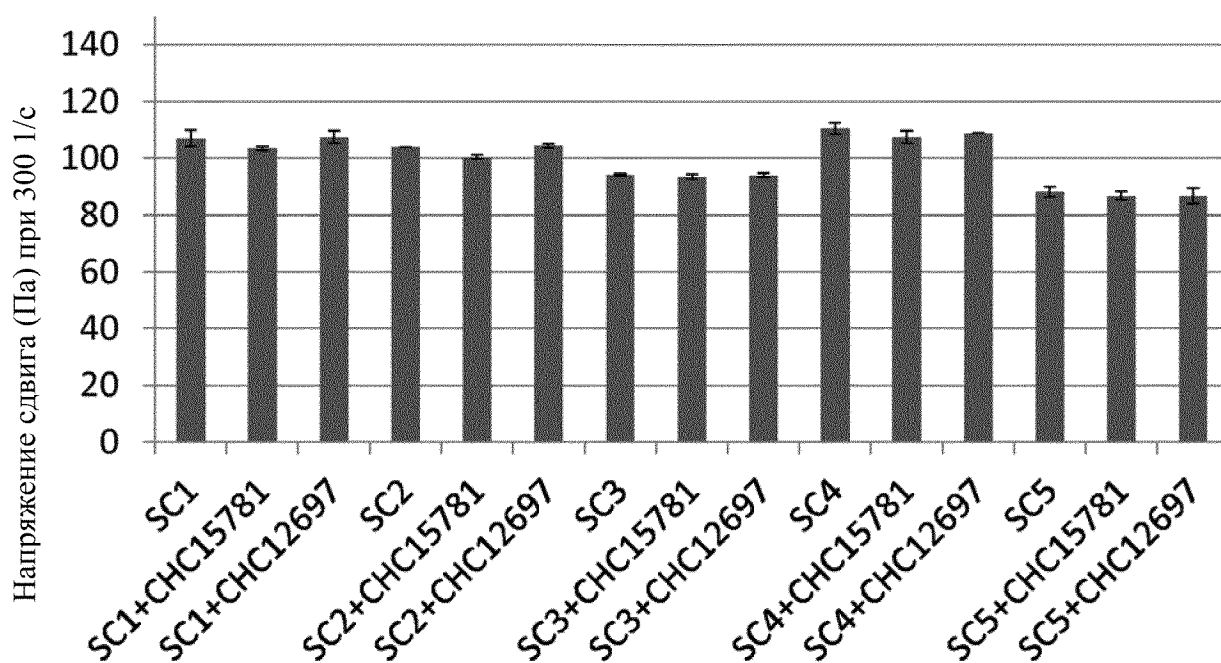
Фиг. 9



Фиг. 10

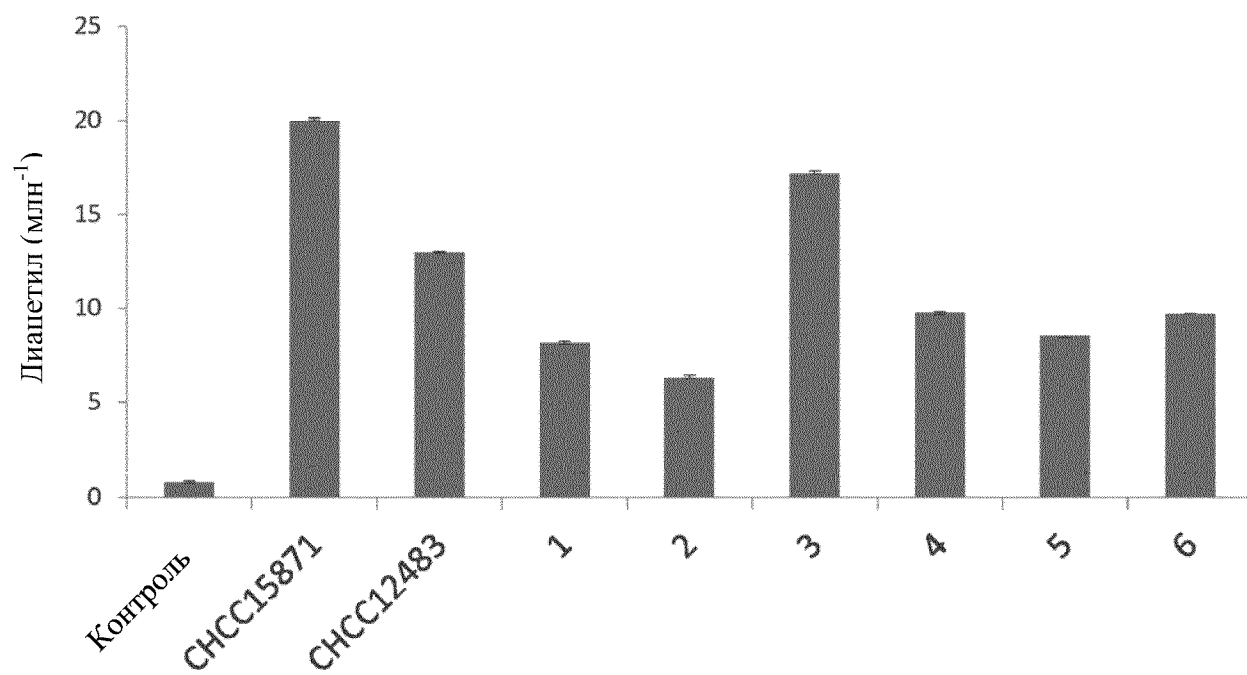


Фиг. 11



Фиг. 12

LACTOBACILLUS RHAMNOSUS
С ПОВЫШЕННЫМ ПРОДУЦИРОВАНИЕМ
ПО ДИАЦЕТИЛУ



Фиг. 13